Aus dem Institut für Virologie der Universität Zürich
(Direktor: Prof. Dr. R. Wyler)

DIFFERENZIERUNG VON BOVINEN HERPESVIREN VOM TYP 1 (BHV-1) MITTELS MONOKLONALER ANTIKOERPER UND MITTELS ZWEIDIMENSIONALER POLYACRYLAMIDGELELEKTROPHORESE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Veterinär-Medizinischen Fakultät
der Universität Zürich

vorgelegt von
Mirta Rüegg
Tierärztin
von Grüningen

Genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. R. Wyler, Referent
Prof. Dr. E. Peterhans, Korreferent

Zürich 1985

Rieker + Partner AG, Glattburgg

Aus dem Institut für Virologie der Universität Zürich
(Direktor: Prof. Dr. R. Wyler)

DIFFERENZIERUNG VON BOVINEN HERPESVIREN VOM TYP 1 (BHV-1) MITTELS MONOKLONALER ANTIKOERPER UND MITTELS ZWEIDIMENSIONALER POLYACRYLAMIDGELELEKTROPHORESE

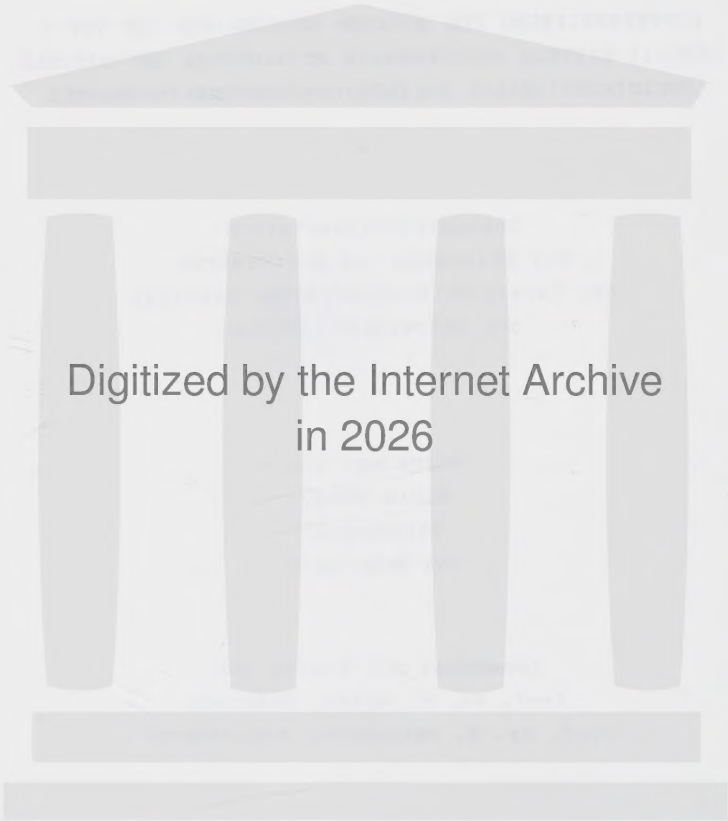
Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Veterinär-Medizinischen Fakultät
der Universität Zürich

vorgelegt von
Mirta Rüegg
Tierärztin
von Grüningen

Genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. R. Wyler, Referent
Prof. Dr. E. Peterhans, Korreferent

Zürich 1985

Rieker + Partner AG, Glattburgg


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41507201_0036

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
	LISTE DER ABKUERZUNGEN	5
	LISTE DER VERWENDETEN CHEMIKALIEN UND DES VERWENDETEN MATERIALS	7
1.	EINLEITUNG	9
2.	MATERIAL UND METHODEN	11
2.1.	Zellkultur und Medium	11
2.2.	Herkunft der monoklonalen Antikörper (MkAk)	11
2.3.	Virusstämme und Stockvirusproduktion	11
2.4.	Serumneutralisationstest (SNT)	13
2.5.	In vivo Markierung viraler Proteine	14
2.6.	Virusreinigung aus dem Zellkultur-Ueberstand und Gewinnung der zellassoziierten Proteine	14
2.7.	Zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese (2-D PAGE)	15
2.7.1.	Isoelektrisches Fokussieren (IEF)	15
2.7.2.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	16
2.8.	Immunoblot	18
2.9.	Indirekter Immunofluoreszenztest (IFT)	19
3.	RESULTATE	21
3.1.	Indirekte Immunofluoreszenz (IF)	21
3.2.	Serumneutralisationstest (SNT)	21
3.3.	Reaktivität der MkAk im Immunoblot	25
3.4.	Zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese (2-D PAGE)	29

4. DISKUSSION 33

5. ZUSAMMENFASSUNG 37

6. LITERATURVERZEICHNIS 38

7. VERDANKUNGEN 41

8. LEBENSLAUF 42

LISTE DER ABKUERZUNGEN

APS	Ammoniumpersulfat
BHV-1	bovines Herpesvirus Typ 1
BL	blank
BSA	bovines Serumalbumin
d.H_2O	destilliertes Wasser
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
eBLC	embryonale bovine Lungenzellen
EDTA	(Titriplex III) Aethylendinitrilotetraessigsäure Dinatriumsalz
EHV-1	equines Herpesvirus Typ 1
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
E'MEM	Eagle's minimal essential medium
GAR-PO	Goat-Anti-Rabbit-Peroxidase
H_2O_2	Wasserstoffsuperoxid
IBR/IPV	infektiöse bovine Rhinotracheitis/ infektiöse pustulöse Vulvovaginitis
IBR-LA_z	zellassoziierte Proteine
IBR-La_p	Virionprotein
IEF	isoelektrisches Fokussieren
IEP	isolektrischer Punkt
IF	indirekte Immunfluoreszenz
LA	Los Angeles
MDBK-Zellen	Madin Darby Bovine Kidney Zellen
MG	Molekulargewicht
MkAk	monoklonale Antikörper
MOI	Multiplizität (multiplicity of infection)
NP-40	Nonidet P-40
NS	Nichtstrukturprotein
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
RAM-FITC	Rabbit-Anti-Mouse-Fluoreszein-Isothiocyanat
RAM-HRPO	Rabbit-Anti-Mouse-Horseradish-Peroxidase
RNase	Ribonuklease

SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
2-D PAGE	zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese
SNT	Serumneutralisationstest
SwAR-FITC	Swine-Anti-Rabbit-Fluoreszein-Isothiocyanat
$TCID_{50}$	tissue culture infectious dose 50%
TEMED	N',N',N',N'-Tetramethylethylendiamin
VP	Virusprotein
ZPE	zytopathischer Effekt

LISTE DER VERWENDETEN CHEMIKALIEN UND DES VERWENDETEN MATERIALS

Acrylamid-Bisacrylamid	Fluka AG, Buchs, Schweiz
Agarose	Sigma, St. Louis, MO. USA
Ampholine	LKB, Luzern, Schweiz
APS	Serva, Heidelberg, BRD
Bio Rad-Apparatur (Trans Blot Cell)	Bio Rad, Glattbrugg, Schweiz
BSA	Armour Pharmaceutical Company Ltd, England
Chloronaphthol	Sigma, St. Louis, MO. USA
Corning Flaschen	Corning Glass Works, Corning, New York, USA
DNase	Sigma, St. Louis, MO. USA
EDTA	Merck, Darmstadt, BRD
En^{3}Hance	NEN, New England Nuclear, Zürich, Schweiz
fötales Rinderserum	North American Biologicals, Miami, USA
GAR-PO	Nordic Immunological Laboratories, Tilburg, Holland
GEL 300 Apparatur	Schleicher und Schüll, Feldbach, Schweiz
Gelatine	Merck, Darmstadt, BRD
Glycine	Merck, Darmstadt, BRD
H_3PO_4	Merck, Darmstadt, BRD
Meerschweinchenkomplement	Behring Werke, Marburg, BRD
2-Mercaptoaethanol	Merck, Darmstadt, BRD
Methanol	Merck, Darmstadt, BRD
$MgCl_2$	Merck, Darmstadt, BRD
Mikrotiterplatten	Becton Dickinson & Co., Oxnard, USA

NaCl	Merck, Darmstadt, BRD
NaOH	Merck, Darmstadt, BRD
Nitrocellulosefolie	Schleicher und Schüll, Feldbach, Schweiz
N, N-Methylenbisacrylamid	Fluka AG, Buchs, Schweiz
Nonidet P-40	Sigma, St. Louis, MO. USA
Objektträger	Bio Mérieux, Lyon, France
Penicillin	Hoechst-Pharma AG, Zürich, Schweiz
Power Supply	Pharmacia, Dübendorf, Schweiz
RAM-FITC	Nordic Immunological Laboratories, Tilburg, Holland
RAM-HRPO	Nordic Immunological Laboratories, Tilburg, Holland
RNase	Sigma, St. Louis, MO. USA
SDS	Bio Rad, Glattbrugg, Schweiz
[^{35}S]-Methionin	NEN, New England Nuclear, Zürich, Schweiz
SwAR-FITC	Nordic Immunological Laboratories, Tilburg, Holland
Streptomycin	Servipharm, Basel, Schweiz
TEMED	Sigma, St. Louis, MO. USA
Trichloressigsäure	Merck, Darmstadt, BRD
Tris-HCl	Merck, Darmstadt, BRD
XAR-5 Film	Eastman Kodak, Lausanne, Schweiz

1. EINLEITUNG

Das bovine Herpesvirus Typ 1 (BHV-1) verursacht eine Rhinotracheitis oder eine Vulvovaginitis, deshalb auch die Benennung IBR/IPV-Virus (infektiöse bovine Rhinotracheitis/infektiöse pustulöse Vulvovaginitis). Daneben manifestiert sich die Infektion gelegentlich auch als eine generalisierte Erkrankung bei Neugeborenen, oder als Enzephalitis, Abort, Keratokonjunktivitis, Metritis, Enteritis oder Mastitis (9,14,19). Die BHV-1 Infektion kann in eine latente Form übergehen. Dabei ist die Virus-DNS je nach dem Ort der primären Virusvermehrung im Trigeminal- oder Sakralganglion zu finden (1,2,10). Eine Reaktivierung der latenten Infektion ist möglich.

Serologisch lassen sich die verschiedenen BHV-1 Stämme nicht unterscheiden. So verhalten sich im Kreuzneutralisationstest Isolate aus dem Genitaltrakt und solche aus dem Atemtrakt identisch (9,11,14,20). Im Serumneutralisationstest (SNT) zeigt das BHV-1 mit BHV-6 eine Kreuzreaktion (7,14). Neuerdings ist von Mohanty et al. (16) berichtet worden, dass mit Hilfe des ELISA auch eine antigene Verwandtschaft zwischen BHV-1 und BHV-4 (Cytomegalovirus) besteht. Eine Differenzierung von BHV-1 Stämmen unterschiedlichster Herkunft gelingt mit der Restriktionsanalyse (6,14,15). Bis heute konnte eine Einteilung in 3 Klassen (auch Typen genannt) (1, 2a/b, 3) vorgenommen werden (14,15, Metzler, pers. Mitteilung).
Die ursprünglich angenommene Korrelation zwischen klinischem Krankheitsbild und dem Restriktionsmuster der Virusnukleinsäure gilt nicht uneingeschränkt. Zwar zeigen die meisten Isolate aus dem Atemtrakt ein Klasse 1-Muster und solche aus dem Genitaltrakt ein Klasse 2-Muster. Aber es finden sich auch Isolate aus dem Respirationstrakt mit einem Klasse 2-Muster (15,17). Hingegen stammen die bisher untersuchten Isolate mit einem Klasse-3-Restriktionsmuster immer von Rindern mit einer nicht-eitrigen Enzephalitis.

Die festgestellten Unterschiede im Genom von BHV-1 widerspiegeln sich in einem klassenspezifischen Proteinmuster, wobei in Analogie zur Restriktionsenzymanalyse sich nur geringgradige Unterschiede im Proteinmuster zwischen Klasse 1- und Klasse 2-Viren finden. Deutlich ausgeprägt sind jedoch die Unterschiede zwischen Klasse 1- und Klasse 2-Viren einerseits und Klasse 3-Viren anderseits (15).

In der vorliegenden Arbeit sollte anhand von 6 ausgewählten BHV-1-Stämmen versucht werden, die im Proteinmuster der eindimensionalen SDS-PAGE festgestellten Unterschiede mittels 2-D PAGE zu bestätigen und eventuell weitere Unterschiede aufzuzeigen.

Weiter wollten wir abklären, ob monoklonale Antikörper (MkAk) im Gegensatz zu konventionellen Seren geeignet sind, antigene Unterschiede zwischen verschiedenen BHV-1-Stämmen zu finden. Zur Beantwortung dieser Frage standen uns 48 mit dem BHV-1-Referenzstamm Los Angeles (LA) induzierte MkAk zur Verfügung. Mittels indirekter Immunofluoreszenz überprüften wir die Reaktivität dieser MkAk mit intrazellulären Antigenen verschiedener BHV-1-Virustämme und untersuchten im Immunoblot-Verfahren die Bindung an elektrophoretisch aufgetrennte zellassoziierte Virusproteine und Virionproteine. Im Serumneutralisationstest (SNT) erhielten wir zudem Auskunft über eine wichtige biologische Eigenschaft der MkAk.

Sowohl in der 2-D PAGE wie auch mit Hilfe der MkAk konnte die Einteilung der BHV-1-Stämme in 3 Klassen bestätigt werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Zellkultur und Medium

Embryonale bovine Lungenzellen (eBLC) und Madin Darby Bovine Kidney (MDBK) Zellen (Flow Laboratories, Baar, Schweiz) wurden in Eagle's minimal essential medium (E'MEM) (Boehringer, Mannheim, BRD) gezüchtet, unter Zusatz von 100 IE/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 10% bei 56°C, 30 Min. inaktiviertem foetalem Rinderserum (North American Biologicals, Miami, U.S.A.). Zur Zellerhaltung wurde E'MEM mit 2% foetalem Rinderserum benutzt. Mit den im Institut routinemässig durchgeführten Nachweisverfahren (SNT, ELISA) erwies sich das foetale Rinderserum als frei von IBR-spezifischen Antikörpern. Für die Virusvermehrung wurden i.d.R. MDBK-Zellen verwendet, da der Infektiositätstiter 10-20 x höher war, als bei Verwendung von eBLC. Einzig für die 2-D PAGE wurden die Viren auf eBLC gezüchtet, weil in diesen Zellen die Wirtszellproteinsynthese i.a. effizienter reduziert wurde.

2.2. Herkunft der monoklonalen Antikörper

Die 48 MkAk, welche in den Experimenten verwendet wurden, stammten aus Zellkulturüberständen von dicht gewachsenen Kulturen. Die entsprechenden Hybridromas sind am Institut für Virologie der Universität Zürich etabliert worden. Die Virusspezifität der MkAk wurde im indirekten IF-Test an BHV-1 infizierten und mock infizierten Zellen geprüft.

2.3. Virusstämme und Stockvirusproduktion

Die verwendeten plaquesgereinigten BHV-1 Isolate mit Angaben über deren Herkunft sind in der Tabelle 1 aufgeführt. Präkonfluente Monolayer wurden mit einer Multiplizität von 0,01 - 0,05 $TCID_{50}$ infiziert und nach einer Stunde Adsorption bei 37°C mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS, pH 7.2) gewaschen. Dann erfolgte

Tabelle 1: Bezeichnung und Herkunft von BHV-1, BHV-6 und EHV-1 Stämmen

Virus Gruppe	Nr.	Stamm	isoliert aus	Staat	Jahr	Passagennummer	Literaturhinweis
BHV-1	1.	LA	Nase	USA	1956	625	Madin et al., 1956
	2.	3156	Lunge	CH	1978	5	Engels et al., 1981
	3.	607	Foet	CH	1978	6	KL
	4.	3399	Lunge	CH	1978	5	Engels et al., 1981
	5.	Calw	Foet	BRD	1981		KL
	6.	Sontheim	Vagina	BRD	1981		KL
	7.	Wien	Vagina	A	1962	6	KL
	8.	Spiel	Nase	BRD	1963	3	Straub et al., 1965
	9.	Miggi	Vagina	CH	1982	4	KL
	10.	Dani	Vagina	CH	1982	4	KL
	11.	Wabu	Preputium	BRD	1962	658	Straub & Böhm, 1962
	12.	K22	Vagina	USA	1958	480	Kendrick et al., 1958
	13.	Freiburg	Vagina	BRD	1962	4	KL
	14.	A 548	Gehirn	Argent.	1982		Schudel et al.
	15.	A 663	Gehirn	Argent.	1982		"
	16.	A 670	Gehirn	Argent.	1982		"
	17.	N 569.7	Gehirn	Austr.	1962		Metzler et al.
BHV-6	18.	E/CH	Organpool	Schweiz	1979		Mettler et al., 1979
EHV-1	19.	57F94	Foet	USA	1958	80	KL

KL: kein Literaturhinweis

Zugabe von E'MEM mit 2% foetalem Serum. Die Inkubation wurde bei 37°C fortgesetzt. Wenn der zytopathische Effekt (ZPE) 80% erreicht hatte (48 - 72 Std. post infectionem), wurden Zellen und Medium 3 x gefroren und getaut, anschliessend 10 Min. bei 1000 x g zentrifugiert und in Portionen bei -70°C aufbewahrt. Die Virustitration erfolgte in Mikrotiterplatten (Falcon 3072, Becton Dickinson, Oxnard, USA) nach der Endverdünnungsmethode mit frisch ausgesäten MDBK-Zellen (10^4 pro Delle). Nach 3 Tagen wurde das Resultat abgelesen und nach Spearman-Kaerber (3) ausgewertet. Die Titer variierten je nach Stamm zwischen $10^{6.5}$ - $10^{8.5}$ $TCID_{50}$/ml.

2.4. Serumneutralisationstest (SNT)

Alle Hybridomaüberstände wurden 30 Min. bei 56°C inaktiviert. Zu 0,3 ml Ueberstand gab man 0,3 ml IBR-LA Virus (1000 $TCID_{50}$/ml). Eine Mikrotiterplatte wurde mit 50 µl MDBK-Zellsuspension pro Delle versehen, und wie das Virus-Antikörper-Gemisch 5 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach beimpfte man die MDBK-Zellen mit je 0,1 ml Virus-Serumgemisch pro Delle (4 Dellen pro Serumverdünnung) und inkubierte die Platten bei 37°C. Als Kontrolle wurden stets ein IBR positives und ein IBR negatives Rinderserum und eine nicht infizierte Zellkontrolle mitgeführt. Die Rücktitration der verwendeten Virussuspension erfolgte in 10er-Schritten (100/10/1 und 0,1 $TCID_{50}$/0,1 ml). Um zu prüfen, ob eine neutralisierende Aktivität der verschiedenen Hybridomaüberstände durch Komplementzusatz eintrete oder diese Aktivität durch "zwei" Antikörper verstärkt würde, gab man 10% Meerschweinchenkomplement (Behring Werke, Marburg, BRD) oder bovines Anti-Mäuse-IgG Antiserum (frei von Antikörpern gegen BHV-1), erhalten von Prof. Peterhans, Bern, in einer Konzentration von 1%, 2%, 4% und 8% zum Virus. Nach 3 Tagen wurde basierend auf dem vorhandenen oder fehlenden ZPE abgelesen.

2.5. In vivo Markierung viraler Proteine

MDBK-Zellen oder eBLC in Corning Flaschen (25 cm^2) (Corning Glass Works, Corning, New York, U.S.A., Art.Nr. 25100) wurden mit einer Multiplizität von 10 $TCID_{50}$ pro Zelle infiziert. Nach einer Stunde Adsorption bei 37°C wurde die Zellkultur 2 x mit PBS gewaschen, anschliessend fügte man 5 ml Medium hinzu (90% methioninfreies E'MEM, 10% E'MEM mit 2% foetalem Rinderserum) und inkubierte 6 Stunden bei 37°C. Danach wurde jeder Flasche 25 µCi [^{35}S]-Methionin (New England Nuclear, NEN, Zürich, Schweiz; 1100 Ci/mmol) zugegeben. Dann wurden die Kulturen für weitere 18 Stunden bei 37°C bebrütet.

2.6. Viruskonzentrierung aus dem Zellkultur-Ueberstand und Gewinnung der zellassoziierten Proteine

Die Viruskonzentration aus dem Zellkulturüberstand erfolgte über mehrere Zentrifugationsschritte: 15 Min. bei 800 x g, 15 Min. bei 4'800 x g und 90 Min. bei 100'000 x g. Dieses Pellet aus dem Ueberstand von 6 x 10^6 Zellen kultiviert in einer Zellkulturflasche (Corning 150 cm^2, Art. Nr. 25120) wurde für die SDS-PAGE in 200 µl Probenpuffer (s. 2.7.2. Puffer E) aufgenommen, 3 Min. bei 100°C erhitzt und bei -70°C aufbewahrt. Für das isoelektrische Fokussieren wurden die gereinigten Viruspräparationen in 80 µl A, 50 µl B und 20 µl C (Abschnitt 2.7.1.) gelöst ohne zu erhitzen. Die noch in der Zellkulturflasche haftenden Zellen wurden mit PBS gewaschen und nach mechanischem Ablösen in Zentrifugenröhrchen gebracht und pelletiert. Jeweils 10^6 Zellen wurden in 0,5 ml SDS-Probenpuffer solubilisiert.

2.7. Zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese (2-D PAGE)

2.7.1. Isoelektrisches Fokussieren (IEF)

Um die Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt aufzutrennen, wurde eine leicht modifizierte Methode nach O'Farrell (18) gewählt.

A Probenpuffer: 9,5 M Harnstoff (Schwarz/Mann, Spring Valley, U.S.A.), 2% (v/v) Nonidet P-40, 2% Ampholine (1,6% pH 5,0 - 7,0, 0,4% pH 3,5 - 10,0) (LKB);

B Ultraschallpuffer: 0,01 M Tris-HCl, pH 7,4, 5 mM $MgCl_2$ (Merck), 50 µg/ml RNase (Sigma);

C DNase Stocklösung: 1 mg/ml in 0,01 M Tris-HCl, pH 7,4, 1 mM $MgCl_2$;

D 30% Acrylamid-Bisacrylamid-Stocklösung: 28,38% (w/v) Acrylamid, 1,62% (w/v) N,N'-Methylen-bisacrylamid;

E Nonidet P-40 Stocklösung: 10% (v/v) NP-40;

F Ampholine: pH 3,5 - 10,0, pH 5,0 - 7,0;

G APS: 10% (w/v);

H Gelüberstandslösung: 8 M Harnstoff;

I Anodenlösung: 0,01 M H_3PO_4

K Kathodenlösung: 0,1 M NaOH

L Probenüberstandlösung: 9 M Harnstoff, 1% Ampholine (0,8% pH 5,0 - 7,0, 0,2% pH 3,5 - 10,0).

A, C, H und L waren bei -20°C aufzubewahren; B, D, E, F, und G bei 4°C, I und K bei Raumtemperatur.

Die Gellösung setzte sich zusammen aus: 5 g Harnstoff, 1,33 ml D, 2,0 ml E, 1,97 ml d.H_2O, 0,4 ml Ampholine pH 5,0 - 7,0, 0,1 ml Ampholine pH 3,5 - 10,0, 10 µl APS und 7 µl TEMED.

Vor der TEMED-Zugabe wurde die Lösung entgast. Mit einer Pasteurpipette wurden Glasröhrchen, welche unten mit Parafilm verschlossen waren, bis ca. 1 cm unterhalb des oberen Randes gefüllt und mit 20 µl Gelüberstandlösung überschichtet. Nach der Polymerisation (1 - 2 Std.) wurde die Gelüberstandlösung durch vorsichtiges Ausschütteln entleert und der Parafilm von der Röhrchenunterseite

entfernt. Dann erfolgte das Montieren der Glasröhrchen in die GEL 300 Apparatur (Schleicher und Schüll). Die [^{35}S]-Methionin markierte Probe wurde aufgenommen in 50 µl A, 50 µl B, 20 µl C und darauf ultrabeschallt. Anschliessend wurden nochmals 30 µl A beigefügt. Fünfzig Mikroliter dieser Probe wurden in das Röhrchen gefüllt. Zuletzt gab man 20 µl Probenüberstandlösung dazu und füllte mit Kathodenlösung auf.
Das untere Reservoir, welches die Kathode darstellt, beschickte man mit 0,01 M H_3PO_4 (~ 0,7 l), das obere (Anode) mit gleichviel 0,1 M NaOH. Nach Entfernung der Luftblasen an der Röhrchenunterseite mittels gebogenem Glasstab, wurde der Strom eingeschaltet. Zuerst 15 Min. mit 200 Volt, dann 30 Min. mit 300 V, anschliessend über Nacht 400 V und am Schluss noch 1 Std. mit 800 V (insgesamt mind. 5000 Vh). Nach dem Elektrophoreselauf wurden die Gele mit destilliertem Wasser aus einer 2 ml Spritze aus den Glasröhrchen gepresst und 5 Min. in Aequilibrierpuffer (s.2.7.2. Puffer E) gebracht. Für die SDS-PAGE wurden die Gele mit Agarose in die Delle im oberen Reservoir der zusammengestellten Elektrophorese-apparatur eingegossen.
Am Ende der SDS-PAGE wurde das Gel für die Fluorographie in 10% Trichloressigsäure (Merck) 1 Stunde fixiert, auf dem Orbitalshaker 1 Stunde in En^{3}Hance (NEN) belassen, unter fliessendem Wasser 30 Min. gewaschen, und anschliessend vakuumgetrocknet und mit einem XAR-5 Film (Eastman Kodak) bei -70°C 2 - 4 Tage exponiert und der Film entwickelt.

2.7.2. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wurde nach der Methode von Lämmli (12) in einem diskontinuierlichen Puffersystem in einer LKB-Apparatur (Vertical Elektrophoresis Unit 2001, LKB, Luzern, Schweiz) durchgeführt.
Verwendete Lösungen:

A 30% Acrylamid-Bisacrylamid-Stocklösung: 29,2% (w/v) Acrylamid und 0,8% (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid (Fluka AG, Buchs, Schweiz) in destilliertem Wasser;
B oberer Gelpuffer: 0,5 M Tris-HCl (Merck Darmstadt, BRD), pH 6,8, 0,4% (w/v) SDS (Bio Rad, Glattbrugg, Schweiz) C unterer Gelpuffer: 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8, 0,4% (w/v) SDS;
D Elektrophoresepuffer, 10 x konzentriert: 0,025 M Tris, pH 8,3, 0,192 M Glycine (Merck), 0,1% (w/v) SDS;
E Probenpuffer oder Aequilibrierpuffer: 0,0625 M Tris, pH 6,8, 10% (w/v) Glycine (Merk), 5% (v/v) 2-Mercaptoaethanol (Merk), 2,3% (w/v) SDS, 0,01% (v/v) Bromphenolblau;
F 10% (w/v) APS (Ammoniumpersulfat) (Serva);
G TEMED (N',N',N',N'-Tetramethylethylendiamin) (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.).
Um ein 10% Gel herzustellen, benötigte man 8,0 ml C, 10 ml A, 14 ml d.H_2O (bidestilliertes Wasser) und 50 µl F. Nachdem diese Lösung entgast war, fügte man 16 µl G hinzu und goss mit einer Pipette die Lösung zwischen die vorbereiteten Glasplatten. Mit ca. 2 ml d.H_2O wurde die untere Gellösung überschichtet. Nach ungefähr einer Stunde war die Polymerisation beendet. Das Wasser wurde abgegossen, der Kamm für die präparative Elektrophorese (110 x 40 mm) eingesetzt und die obere Gellösung eingefüllt, welche aus 2,5 ml B, 1,5 ml A, 6 ml d.H_2O, 30 µl F (hier entgasen) und 10 µl G bestand. Nach einer weiteren Stunde konnte der Kamm entfernt werden. Mit Laufpuffer wurde bis knapp unter den oberen Glasrand aufgefüllt und die Probe mit einer Mikropipette vorsichtig in den Slot eingefüllt. Die Proben bestanden aus IBR-LA_z (zell-assoziierte Proteine), aus IBR-LA_p (Virionprotein), mit [^{35}S]-Methionin radioaktiv markiert oder unmarkiert. Nach Endmontage der Apparatur wurden in das untere Reservoir 2 l destilliertes Wasser und ca. 1,5 l D, in das obere ca. 0,5 l D eingefüllt. Bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA pro Gel wurde elektrophoretisiert. Die Stromzufuhr wurde unterbrochen, wenn die Bromphenolblaufront den unteren Gelrand erreichte, was in der Regel nach ca. 4 Stunden der Fall war.

2.8. Immunoblot

Die Uebertragung der markierten oder unmarkierten Proteine auf eine Nitrocellulose erfolgte nach der Methode von Burnette (5) in einer Bio Rad-Apparatur (Trans Blot Cell, Bio Rad, Glattbrugg, Schweiz).
Das SDS-Polyacrylamidgel wurde sofort nach der beendeten Elektrophorese in ein "Sandwich" gebracht: schaumgummiähnliche Unterlage, 3 Lagen Filterpapier, Gel, Nitrocellulosefolie (Schleicher und Schüll, Feldbach, Schweiz, Cellulosenitrat No Ba 85), 3 Lagen Filterpapier und schaumgummiartige Unterlage. Das "Sandwich" in der Plastikhalterung wurde so in den Blotkasten gestellt, dass die Nitrocellulosefolie gegen die Anode gerichtet war. Der Laufpuffer setzte sich aus 600 ml Methanol (Merck), 42 g Glycine (Merck), 9 g Tris, 0,3 g SDS ad 3000 ml d.H_2O, pH ca. 8,3, zusammen. Der Proteintransfer erfolgte bei konstanter Spannung (3 V/cm) über Nacht. Am nächsten Morgen wurde die Folie luftgetrocknet und in Streifen von 3 oder 4 mm Breite geschnitten. Bei Raumtemperatur und in der Dunkelheit konnten diese Streifen über Wochen aufbewahrt werden.
Um die Reaktivität der MkAk mit den transferierten Proteinen zu testen, wurde ein dem ELISA ähnliches Verfahren angewendet. Auf das Antigen wird ein MkAk gebracht, dann das Konjugat (hier 2, um die Reaktion besser sichtbar zu machen) und am Schluss das Substrat, welches eine Farbumwandlung bei erfolgter Reaktion hervorruft. Die freien Proteinbindungsstellen auf den Nitrocellulosestreifen wurden zuerst mit 1% BSA (Armour Pharmaceutical Company Ltd., England) in Sättigungspuffer [50 mM (w/v) Tris-HCl, pH 7,4, 140 mM NaCl (Merck), 5 mM EDTA (Titriplex III, Merck), 0,05% (v/v) Nonidet P-40 (Sigma), 0,25% (w/v) Gelatine (Merck)], in einer Plastikwanne mit Unterteilung für die Streifen 1 Stunde getränkt. Nach einem Waschvorgang von 3 x 10 Min. mit Sättigungspuffer wurden die Streifen in mit 1:10 verdünntem Hybridomaüberstand über Nacht auf einem Orbitalshaker

belassen und anschliessend 3 x 5 Min. und 2 x 15 Min. mit frischem Puffer gewaschen. Das erste Konjugat RAM-HRPO (Rabbit-Anti-Mouse-Horseradish-Peroxidase, Nordic Immunological Laboratories, Tilburg, Holland) wurde in einer Verdünnung von 1:2000 in Sättigungspuffer mit 1% BSA dazugegeben, und nach 2 Stunden Verbleiben auf dem Orbitalshaker wusch man die Streifen wieder mit Puffer ohne BSA (3 x 5', 2 x 15'). Das 2. Konjugat GAR-PO (Goat-Anti-Rabbit-Peroxidase, Nordic) wurde in gleicher Verdünnung wie oben zugegeben. Nach 2 Stunden Inkubation auf dem Orbitalshaker wurden die Streifen mit PBS 3 x 5 Min. und 2 x 15 Min. gewaschen. Anschliessend wurde das Substrat zugefügt [0,3 ml 0,3% Chloronaphthol in Methanol (Sigma), 4,7 ml PBS und 1 µl 30% H_2O_2]. Die Farbentwicklung wurde kontrolliert, und nach 5 - 60 Min. mit destilliertem Wasser gestoppt. Dann wurden die Streifen in destilliertem Wasser gewaschen, getrocknet, fotografiert, respektive autoradiographiert. Die Streifen sollten im Dunkeln aufbewahrt werden, damit die Farbe erhalten bleibt. Für die Autoradiographie wurde ein XAR-5 Film (Eastman Kodak, Lausanne, Schweiz) auf die Blotstreifen gelegt, 3 Tage bei -70°C exponiert und anschliessend entwickelt. Mit der Autoradiographie wird kontrolliert, ob die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteinbanden auf den Nitrocellulosestreifen transferiert worden sind. Zudem zeigt das Autoradiogramm die Position der auf den Nitrocellulosestreifen übertragenen Proteine an (Marker für ELISA).

2.9. Indirekter Immunfluoreszenztest (IFT)

Monolayer aus MDBK-Zellen wurden mit den einzelnen Virusstämmen (Tab. 1) mit einer MOI von 10 infiziert. Vierundzwanzig Stunden post infectionem wurden die Zellen 1 x mit PBS gewaschen, abgeschabt und in PBS resuspendiert (Konzentration ca. 500'000 Zellen/ml). Auf azetonresistente Objektträger mit 21 flachen Dellen (Bio Mérieux, Lyon, France, Nr. 75771) wurde pro Delle 5 µl Zellsuspension

gegeben. Danach wurden die Objektträger unter Warmluft getrocknet, anschliessend 20 Min. in Azeton bei -20°C fixiert und wieder unter Warmluft getrocknet. So behandelte Objektträger liessen sich über längere Zeit bei -20°C aufbewahren.

Den eigentlichen IF-Test führte man wie folgt durch: 5 µl der unverdünnten Hybridomaüberstände wurden auf die einzelnen Dellen gegeben. Anschliessend wurde 20 Min. bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wurden die Objektträger auf dem Orbitalshaker gewaschen (2 x 10' in PBS, kurz in destilliertem Wasser) und unter Warmluft getrocknet. Dann wurden 5 µl RAM-FITC Konjugat (Rabbit-Anti-Mouse-Fluoreszein-Isothiocyanat, Nordic Immunological Laboratories, Tilburg, Holland) 1:100 verdünnt in die Delle abgefüllt, 20 Min. bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert, gewaschen und getrocknet wie oben. Als 2. Konjugat fand SwAR-FITC (Swine-Anti-Rabbit-Fluoreszein-Isothiocyanat, Nordic) in einer Verdünnung von 1:100 Verwendung. Anschliessend wurde wieder gewaschen, getrocknet und zuletzt ein Deckglas mit 3 Tropfen Glycerin-PBS (1:1) montiert.

3. RESULTATE

3.1. Indirekte Immunfluoreszenz (IF)

Alle 48 MkAk zeigten mit der Zellkontrolle und dem EHV-1 keine Reaktion und sind somit als BHV-1 spezifisch zu betrachten. Sie wurden mit den in Tabelle 1 aufgeführten Virusstämmen auf ihre Reaktivität geprüft (Tab. 2). Mit den Klasse 1-Viren (LA, 3156, 607, 3399 und Calw) reagierten alle 48 MkAk. Ausser mit dem Stamm Wien, der nicht mit dem MkAk 1213, Stamm Sontheim, der nicht mit dem MkAk 1110 sowie Stamm Freiburg, der nicht mit dem MkAk 1242 reagierte, zeigten 47 der 48 MkAk mit allen Klasse 2-Viren (Sontheim, Wien, Spiel, Miggi, Dani, Wabu, K_{22}, Freiburg) eine Reaktivität. Eine Ausnahmestellung kam dem MkAk 1238 zu, mit dem zwischen Klasse 1- und Klasse 2-Virusstämmen unterschieden werden konnte, indem der MkAk 1238 ausschliesslich mit Virusstämmen der Klasse 1 reagierte. 15 MkAk reagierten mit allen Klasse 3-Viren (A548, A663, A670, N569). Der Stamm N569 wurde zudem noch von den MkAk 1223, 1242 und 1216, Stamm A670 von den MkAk 1204, 1242 und 1216, Stamm A663 von den MkAk 1223, 1224, 1229, 1242 und 1216 und Stamm A548 von den MkAk 1204, 1233, 1224 und 1229 erkannt. Der mitgeführte BHV-6 Stamm E/CH reagierte mit 9 (12,18,1201,1202,1214,1223,1240,1242, 1216) der 48 MkAk.
Somit reagierten 48 MkAk mit dem BHV-1 Klasse 1, 47 respektive 46 mit dem Klasse 2, 18-20 MkAk mit dem Klasse 3, 9 mit dem BHV-6 Stamm E/CH und keiner mit EHV-1 (Tabelle 3).

3.2. Serumneutralisationstest (SNT)

Alle verfügbaren MkAk wurden auf ihre neutralisierende Aktivität gegenüber Stamm LA untersucht. Dabei zeigten 2 MkAk (1111,1240) eine Neutralisation mit unverdünntem Hybridomaüberstand. Die Zugabe von 10% Meerschweinchenkomplement oder von bovinem Anti-Mäuse-Immunglobulin in

Tabelle 2 Reaktivität von monoklonalen Antikörpern in der indirekten Immunfluoreszenz.

Virusgruppen/ Virustypen	Virusstämme	MoAk 12	18	55	60	62	64	72	74	88	122	131	141	147	1101	1103	1104	1105	1106	1108	1109	1110	1111	1117	1118
BHV-1/1	LA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	3156	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	607	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	3399	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Calw	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
BHV-1/2	Sontheim	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	⊖	+	+	+
	Wien	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Spiel	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Miggi	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Dani	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	Wabu	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	K_{22}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	Freiburg	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
BHV-1/3	A 548	+	+	−	−	+	+	−	−	−	−	−	+	−	−	−	+	+	+	+	−	−	−	−	−
	A 663	+	+	−	−	+	+	−	−	−	−	−	+	−	−	−	+	+	+	+	−	−	−	−	−
	A 670	+	+	−	−	+	+	−	−	−	−	−	+	−	−	−	+	+	+	+	→	−	−	−	−
	N 569.7	+	+	−	−	+	+	−	−	−	−	−	+	−	−	−	+	+	+	+	−	−	−	−	−
BHV-6	E/CH	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
EHV-1		−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Zellkontrolle		−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−

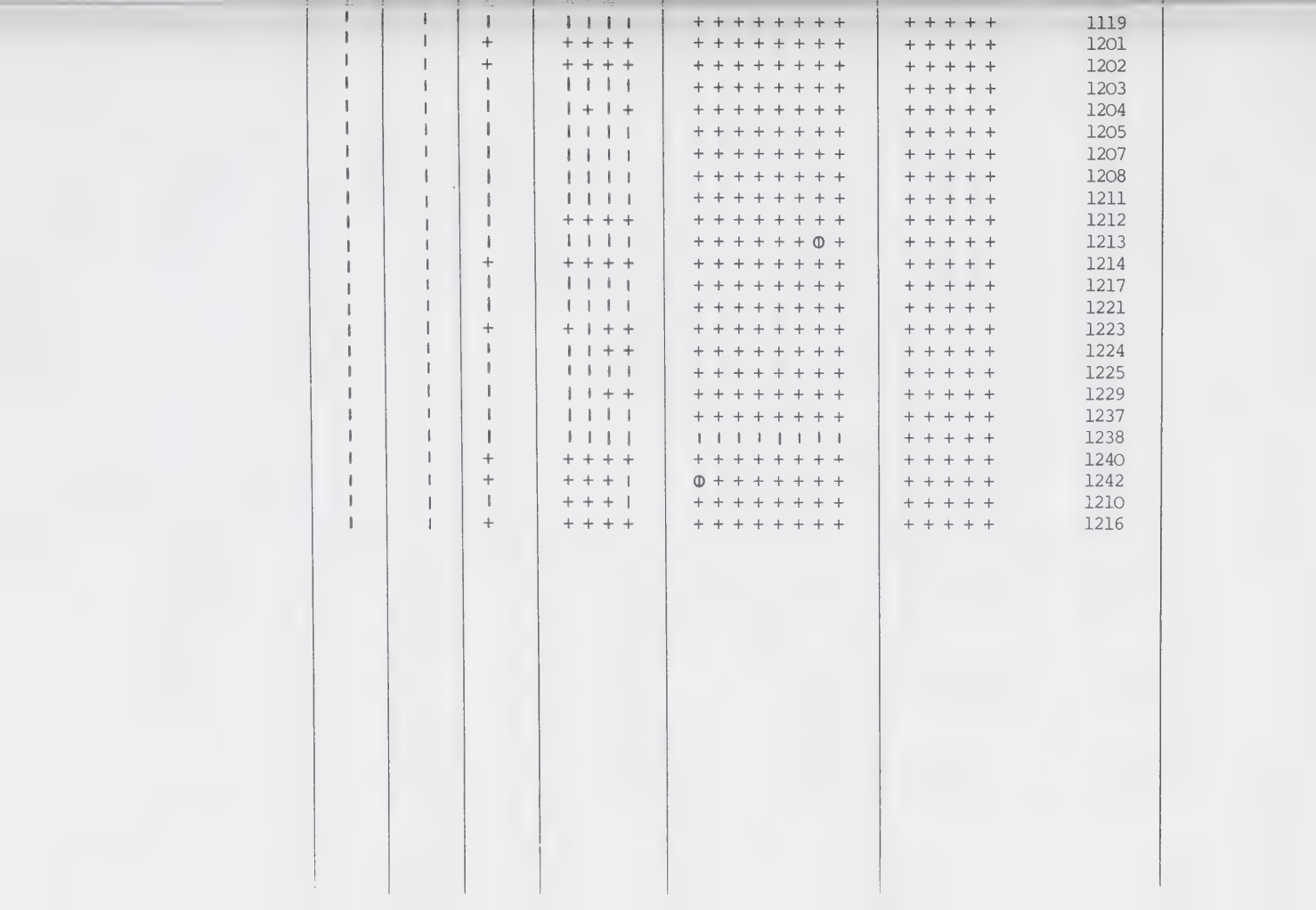

1119
1201
1202
1203
1204
1205
1207
1208
1211
1212
1213
1214
1217
1221
1223
1224
1225
1229
1237
1238
1240
1242
1210
1216

Tabelle 3

Reaktivität in der Immunfluoreszenz von 48 mit dem BHV-1 Stamm LA induzierten MkAk gegenüber verschiedenen BHV-Stämmen und einem EHV-1 Stamm.

BHV-1 Klassen	Virusstämme	Anzahl MkAk
BHV-1/1	LA	48
	3156	48
	607	48
	3399	48
	Calw	48
BHV-1/2	Sontheim	46
	Wien	46
	Spiel	47
	Miggi	47
	Dani	47
	Wabu	47
	K22	47
	Freiburg	46
BHV-1/3	A 548	20
	A 663	19
	A 670	18
	N 569.7	18
BHV-6	E/CH	9
EHV-1		0

einer Konzentration von 1%, 2%, 4% und 8% blieb ohne Effekt.

3.3. Reaktivität der MkAk im Immunoblot

Die Reaktivität von 48 MkAk wurde mit zellassoziiertem Virusantigen vom Stamm LA (LA_z) und mit [^{35}S]-Methionin markiertem Virionantigen (LA_p) geprüft. 18 MkAk reagierten mit LA_p-Protein (Fig. 1) und 26 MkAk mit LA_z-Protein (Fig. 2). MkAk, die im Immunoblot-Verfahren mit LA_p reagierten, zeigten auch eine Reaktion mit LA_z. Wie aus der Tabelle 4 ersichtlich ist, liessen sich die reaktiven MkAk in 6 Gruppen einteilen. In der 1. Gruppe figurierten 3 (1205,147,131) (Fig. 1) bzw. 4 MkAk (1205,147,1209,131) (Fig. 2), die mit Proteinen vom MG 87-96'000 reagierten. Die 2., grösste Gruppe, umfasste 12 (LA_z) / 8 (LA_p) MkAk (1101, 122, 60, 1111, 1110, 1210, 1203, 1217, + 55, 72, 74, 88) die mit dem Virusprotein 17 (VP 17) reagierten. Vier dieser MkAk (1101, 122, 60, 1111) reagierten zusätzlich mit VP 7 im MG-Bereich von 126'000. Alle reagierten mit Proteinen mit einem MG von 74'000. Die MkAk 18 und 12 aus der Gruppe 3 reagierten im MG-Bereich von 64 - 67'000 und mit multiplen Proteinspezies von höherem und niedrigerem MG. Aus der Gruppe 4 reagierte der MkAk 1212 im MG-Bereich von 55'000 und die MkAk 1239, 1230 und 1227 aus der Gruppe 5 im Bereich von 135'000 mit dem Nichtstrukturprotein d (NS d) und mit weiteren zellassozierten Proteinen. In der letzten Gruppe waren 4 MkAk (1231, 1216, 1210, 1221) in der MG-Region von 34 - 35'000 zu finden, von denen 2 (1231, 1216) noch in der MG-Region von 96'000 reagierten. Im LA_z-Blot reagierten noch 3 (1231, 1216, 1210) mit Proteinen von höherem und niedrigerem Molekulargewicht. Der Streifen mit BL (blank) bezeichnet, wurde nicht mit MkAk inkubiert und zeigte somit auch keine Reaktion.

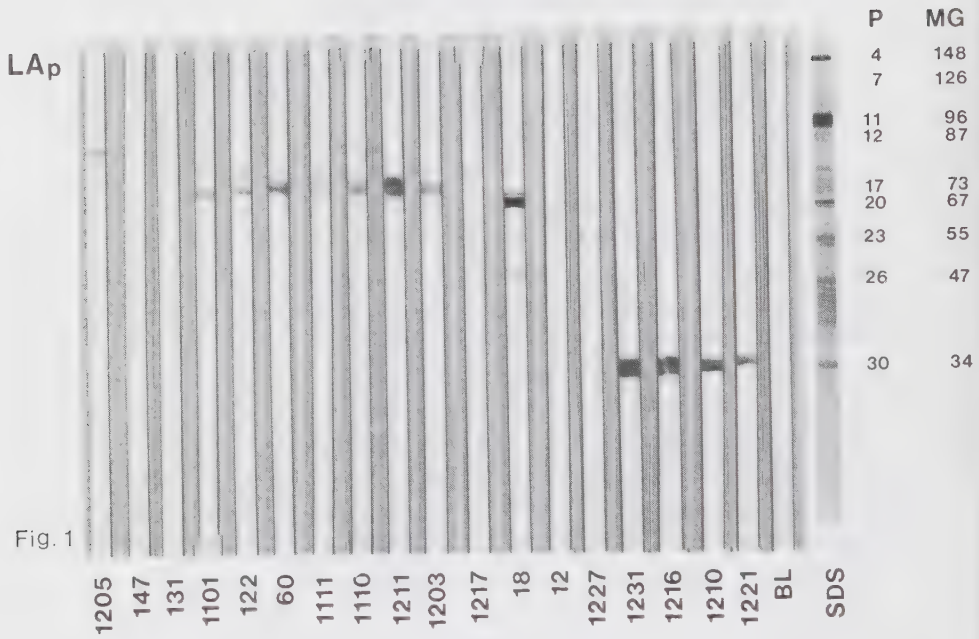


Fig. 1

Figur 1

Reaktivität von 18 MkAk im Immunoblot. Man liess die MkAk mit [^{35}S]-Methionin markiertem Virionprotein (LA_p) des BHV-1 Stammes LA reagieren. Die Proteine sind durch die enzymatische Farbreaktion sichtbar geworden. BL (blank) ist ein Kontrollstreifen (inkubiert mit Puffer anstatt MkAk). Auf dem letzten Streifen (Autoradiographie) sind die Polypeptide des Stammes LA nach SDS-PAGE dargestellt, mit der Angabe der Molekulargewichte (MG) und der Bezeichnung der Proteine (P) nach Metzler (15).

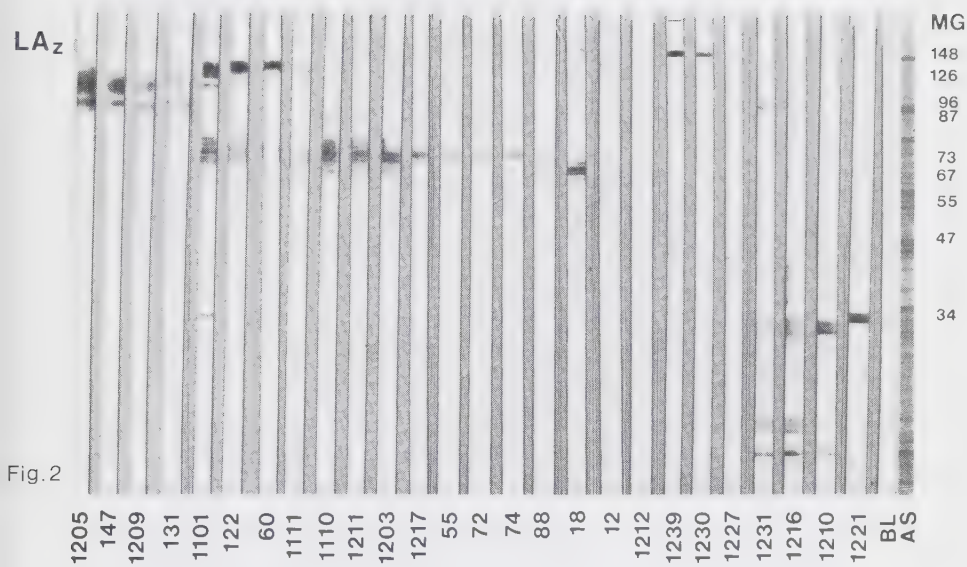


Fig.2

Figur 2

Reaktivität von 26 MkAk im Immunoblot. Die MkAk liess man mit nicht-markiertem zellassoziiertem Antigen (LA_Z) des Stammes LA reagieren. Die Proteine sind durch die enzymatische Farbreaktion sichtbar geworden.
BL: blank (wie in Fig. 1). Letzer Streifen: Polypeptide des Stammes LA mit Amidoschwarz gefärbt. MG: Molekulargewicht.

Tabelle 4

Reaktivität von BHV-1/LA-spezifischen monoklonalen AK im Immunoblot unter Verwendung von zellassoziiertem (z) resp. Virion (p) Antigen

Gruppe	MkAk	Reaktivität mit LAz	LAp	MG des(r) reaktiven Proteins(e)	Virusprotein Bezeichnung gemäss (15)
1	1205	+	+	96/87	10,12
	147	+	+	96/87	10,12
	131	+	+	96/87	10,12
	1209	+	-	96/87	10,12
2	1101	+*	+	74/126*	7/17
	122	+*	+	74/126*	7/17
	60	+*	+	74/126*	7/17
	1111	+*	+	74/126*	7/17
	1110	+	+	74	17
	1211	+	+	74	17
	1203	+	+	74	17
	1217	+	+	74	17
	55	+	-	74	17
	72	+	-	74	17
	74	+	-	74	17
	88	+	-	74	17
3	18[a]	+	+	67 - 64	19,20,21
	12[a]	+	+	67 - 64	20,21
4	1212	+	+	55	2335
5	1239[a]	+	-	135	NS d
	1230[a]	+	-	135	NS d
	1227[a]	+	-	135	NS d
6	1231	+*	+*	35-34/96*	11,30,31
	1216	+*	+*	35-34/96*	11,30,31
	1210	+	+	35-34	30,31
	1221	+	+	35-34	30,31

a = Reaktion der MkAk mit weiteren Polypeptiden
NS = Nichtstrukturprotein
* = zusätzlich Reaktion im MG-Bereich von 126/96

3.4. Zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese (2-D PAGE)

Die 2-D PAGE des BHV-1 Stammes LA, bekannt als Klasse 1-Virus, Spiel als Klasse 2a-Virus, K_{22} als Klasse 2b-Virus sowie A663, ein Enzephalitisstamm zu den Klasse 3-Viren gehörend, ergaben ein klassenspezifisches Muster (Fig. 3-6). Eine Kongruenz der "Spots" war bei der elektrophoretischen Auftrennung von Stamm LA und 607 sowie zwischen Wien und Spiel zu beobachten. Klasse 1- und Klasse 2-Viren differierten im Protein VI sowohl was das Molekulargewicht (MG) anbetraf, das bei den Klasse 2-Viren höher war, als auch bezüglich des isoelektrischen Punktes (IEP), der bei den Klasse 2-Viren näher bei der Kathode lag. Auch das Protein VIII liess eine Unterscheidung zwischen Klasse 1 und Klasse 2 zu, da der IEP von Klasse 1 im stärker alkalischen Bereich lag. Die Proteine I und II von Klasse 1 stimmten mit denjenigen von Klasse 2b überein, nicht aber die Proteine III und IV, welche einen IEP im niedrigeren pH-Bereich aufwiesen als Klasse 1. Umgekehrt hatten die Proteine III und IV von Klasse 1 und 2a das gleiche MG und den gleichen IEP, aber Klasse 1 besass einen IEP der Proteine I und II, der in einem höheren pH-Bereich lag. Klasse 1 und Klasse 2 unterschieden sich grundsätzlich von Klasse 3. Deren Proteine I,II,III und IV stimmten am ehesten mit dem Stamm K_{22} überein. Ansonsten waren die Polypeptide XIII und XIV als gemeinsame Proteine aller Virusklassen zu erkennen.
Ein BHV-1 Vertreter gehörte also aufgrund der klassenspezifischen Unterschiede der Proteine VI und VIII entweder zu den Klasse 1- oder Klasse 2-Viren. Zu den Klasse 3-Viren wurden sie gezählt, wenn der dem Klasse 1- und 2-Muster eigene Bogen aus Protein V,VI,VII und VIII fehlte.

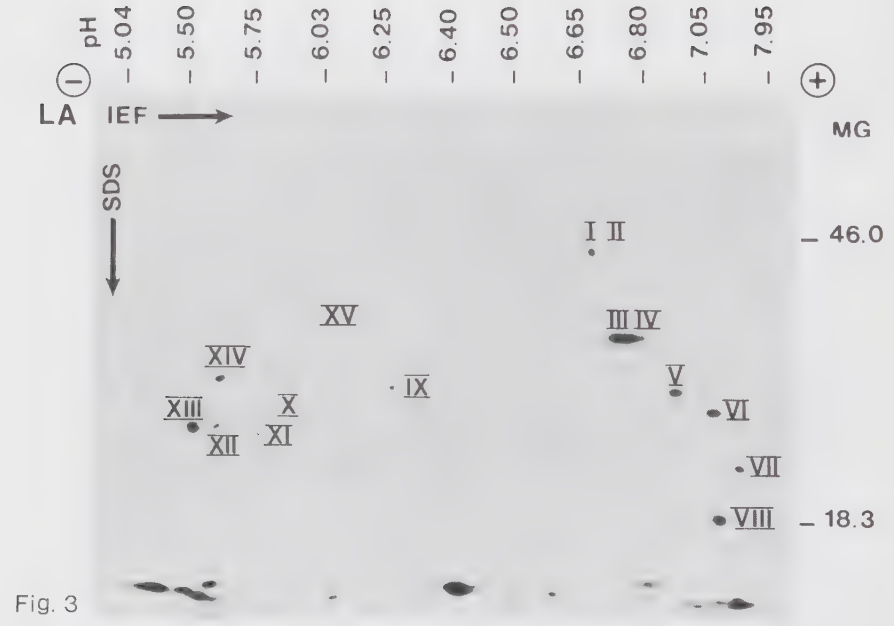

pH
5.04
5.50
5.75
6.03
6.25
6.40
6.50
6.65
6.80
7.05
7.95
LA
IEF
MG
SDS
I II
III IV
V
VI
VII
VIII
IX
X
XI
XII
XIII
XIV
XV
46.0
18.3

Fig. 3

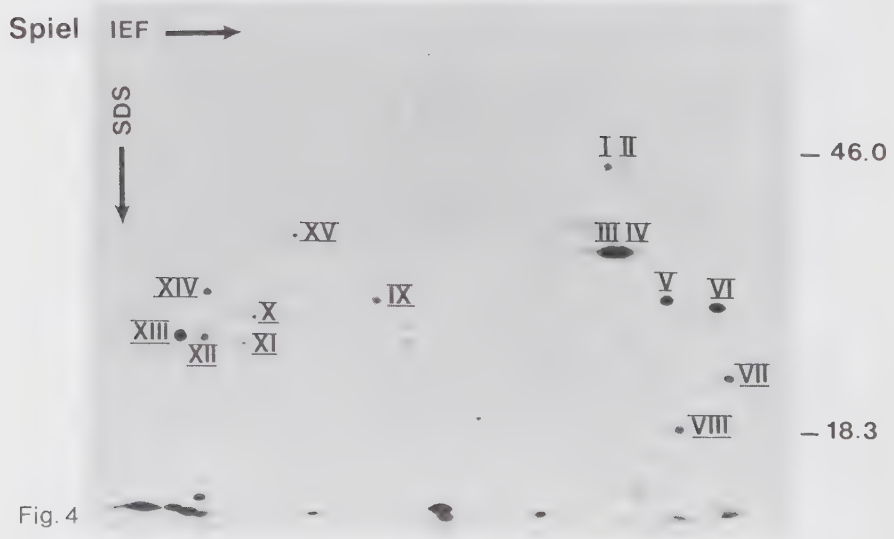

Spiel
IEF
SDS
I II
III IV
V
VI
VII
VIII
IX
X
XI
XII
XIII
XIV
XV
46.0
18.3

Fig. 4

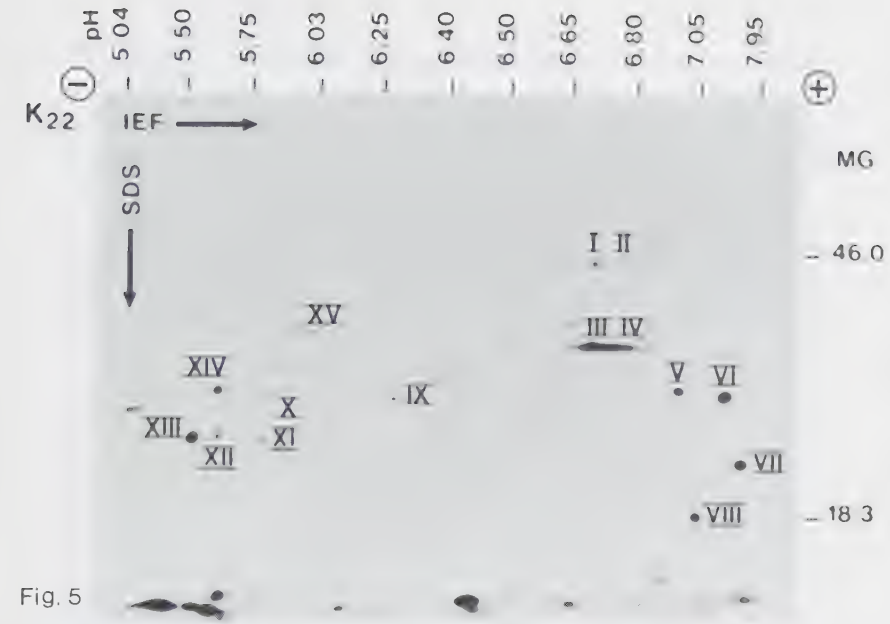

pH
5.04
5.50
5.75
6.03
6.25
6.40
6.50
6.65
6.80
7.05
7.95
⊖
⊕
K22
IEF
SDS
MG
46.0
18.3
I II
III IV
V
VI
VII
VIII
IX
X
XI
XII
XIII
XIV
XV

Fig. 5

A663
IEF
SDS
46.3
18.3
I II
III IV
XIII
XIV

Fig. 6

Figuren 3 - 6

Analyse von [^{35}S]-Methionin markierten BHV-1 in der zweidimensionalen Polyacrylamidgelelektrophorese (2-D PAGE). Entlang der horizontalen Achse wurden die Polypeptide durch isoelektrisches Fokussieren in einem pH-Bereich von 5.0 - 8.0 aufgetrennt und entlang der vertikalen Achse mit der SDS-PAGE (10%) nach ihrem Molekulargewicht (MG). I - XV stellen die markantesten Polypeptide dar. Klasse 1-Viren: Stamm LA (Fig. 3) und Klasse 2-Viren: Stamm Spiel (2a) und Stamm K_{22} (2b) (Fig. 4 und 5). Klasse 3-Viren: Stamm A663 (Fig. 6).

4. DISKUSSION

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass es mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern und mittels der zweidimensionalen Polyacrylamidgelelektrophorese möglich ist, BHV-1 Stämme in 3 Klassen einzuordnen. Es handelt sich dabei um dieselben Klassen, welche auch aufgrund des Restriktions- und des Proteinmusters der SDS-PAGE eruiert wurden.
Die MkAk wurden auf der Basis der Immunfluoreszenz mit dem Stamm LA etabliert. Die Zahl der reaktiven MkAk richtete sich nach der Methode, die zu deren Nachweis verwendet wurde.
So reagierten im Immunoblot weniger MkAk als im IF-Test. Das könnte auch durch die Wirkung der Detergentien bedingt sein. SDS bindet an das Protein, was eine negative Ladung und eventuell eine Konformationsänderung zur Folge hat. Das Erkennen von 12 Proteinen durch die MkAk deutet auf ein weites Spektrum von reaktiven Epitopen hin. Mehrere MkAk reagierten aber mit Proteinen in der gleichen Molekulargewichtsregion. Es fanden sich 3 Gruppen von MkAk, die deutlich mit denselben Proteinen reagierten (z.B. 12,17,20,30). Das weist auf eine gute immunogene Eigenschaft dieser Proteine hin. Häufig befinden sind solche Proteine auf der Virusoberfläche und sind glykosyliert. Anderseits gibt es aber einzelne MkAk, die eine Affinität zu verschiedenen Proteinen mit gleicher antigener Determinante aufwiesen. Interessanterweise wurde dieses Phänomen häufiger bei den zellassoziierten Virusproteinen als bei den Virionproteinen beobachtet. Dies legt die Vermutung nahe, dass es sich um Epitope auf Vorläuferproteinen und deren Produkte handeln könnte. Diese Interpretation könnte durch pulse-chase Experimente überprüft werden. Daraus resultierte wiederum eine grössere Anzahl MkAk als in Fig. 1, wo MkAk nur an Strukturproteine banden.

Mit dem SNT wollten wir prüfen, inwieweit die verfügbaren MkAk die Virusinfektiosität neutralisieren. Die Feststellung, dass von den 48 MkAk nur gerade 2 (1111, 1240) eine neutralisierende Wirkung aufwiesen, besagt, dass nur diese beiden MkAk an Epitope binden, die für eine Virusneutralisation von Bedeutung sind. Die anderen MkAk binden entweder an Epitope, die für eine Virusneutralisation unbedeutend sind, oder dann an Proteine, die wegen ihrer Lage im Innern des Viruspartikels nicht zugänglich sind (13). Aus den Ergebnissen des SNT und des Immunoblots lässt sich folgern, dass das vom MkAk 1111 erkannte Hauptprotein 17 die Eigenschaft hat, virusneutralisierende Antikörper zu induzieren. Diese Feststellung erscheint beim Einsatz von Spaltvakzinen von Bedeutung.
Die bisherigen Befunde können dahingehend interpretiert werden, dass die untersuchten 48 MkAk eine grosse Zahl verschiedener Epitope erkennen. Auf dieser Erkenntnis basierend erschien es gerechtfertigt, eine grössere Zahl von Virusstämmen (Tab. 1) im indirekten Immunfluoreszenztest auf das Vorhandensein von antigenen Unterschieden zu untersuchen.
Alle 48 MkAk reagierten mit den Klasse 1-Viren. Dieser Befund widerspiegelt die wahrscheinlich weitgehende antigene Identität von Klasse 1-Viren.
Bei der Ueberprüfung von Klasse 2-Viren zeigte der MkAk 1238 mit keinem dieser Virusstämme eine Reaktion. Dieser Antikörper könnte sich deshalb als nützlich für eine Unterscheidung zwischen Klasse 1- und Klasse 2-Viren erweisen. Drei weitere MkAk (1110, 1213, 1242) reagierten jeweils mit einem einzelnen Klasse 2-Virusstamm nicht. Diese Befunde führen zur Schlussfolgerung, dass Klasse 1- und Klasse 2-Viren nur geringgradige antigene Unterschiede aufweisen.
Bei der Ueberprüfung der Gehirnisolate ergaben die fluoreszenzserologischen Untersuchungen, dass diese Virusstämme erhebliche antigene Unterschiede zu den Virusklassen 1 und 2 aufweisen. Diese Beobachtung stimmt mit den festgestellten spezifischen Proteinmustern der

SDS-PAGE überein (Metzler, persönliche Mitteilung). Die Feststellung, dass 9 der 48 MkAk sowohl mit BHV-6 und BHV-1 reagierten, widerspiegelt die bestehende serologische Beziehung zwischen diesen beiden Virusgruppen.

6 ausgewählte BHV-1 Stämme wurden in der zweidimensionalen Polyacrylamidgelelektrophorese (2-D PAGE) miteinander verglichen. Engels et al. (8) waren in der Lage, mittels Restriktionsanalyse der DNS dank dem Unterschied bei zwei Fragmenten BHV-1 Viren in die Klassen 1 und 2, und dank einer Differenz bei einem 3. Fragment weiter in Subklasse 2a und 2b einzuteilen. Mit Hilfe der SDS-PAGE gelang es Metzler et al. (15), 2 klassenspezifische und 2 subklassenspezifische Unterschiede darzustellen. Es war zusätzlich möglich, mittels der 2-D PAGE eine Virusklassifizierung aufgrund klassenspezifischer Unterschiede vorzunehmen. Auch hier zeigte sich im Proteinmuster die weitgehende Aehnlichkeit zwischen Klasse 1- und Klasse 2-Viren. Eine Uebereinstimmung ergab sich bei den Stämmen LA und 607, die der BHV-1 Klasse 1 zugeteilt werden, und bei Stamm Wien und Stamm Spiel, welche der BHV-1 Klasse 2a angehören. Der den Klasse 3-Viren zugeordnete Stamm A663, hob sich im Proteinmuster deutlich von den anderen Klassen ab. Aber aufgrund der Polypeptide I,II,III,IV,XIII,XIV und der Polypeptide in der Pufferfront, kann auf eine verwandtschaftliche Beziehung zu den Klasse 1- und Klasse 2-Viren geschlossen werden.

Trotz der zweidimensionalen Auftrennung von Virusprotein, traten nur geringfügige weitere Unterschiede (2 klassenspezifische, je 2 subklassenspezifische) hervor, als bei der eindimensionalen Auftrennung. Der Grund dafür könnte darin liegen, dass der eingeschränkte pH-Bereich (5.0 - 8.0) Proteine mit einem IEP in dieser Zone selektionierte. Es wäre aber auch möglich, dass die sich unterscheidenden Polypeptide in der 2-D PAGE nicht weiter aufgetrennt wurden, als in der SDS-PAGE.

Trotzdem erlauben die vorliegenden Resultate eine eindeutige Einteilung der untersuchten BHV-1 Stämme in Klasse 1, Klasse 2 und Klasse 3. Die Polypeptide VI und VIII ergaben eine Einteilung in Klasse 1 und 2. In Subklasse 2a und 2b konnte eine Unterteilung mit den Proteinen I-IV vorgenommen werden und aufgrund des fehlenden Proteinbogens aus V, VI, VII und VIII in Klasse 3.

Zum Schluss seien noch zwei methodische Hinweise gegeben. Vor der Elektrophorese sind die Proteine mit DNase zu behandeln, da sonst Präzipitate an der Auftragestelle entstehen, die den Proteineintritt ins Gel hemmen. Auch vermögen in der Probe enthaltene Proteinasen Proteine abzubauen, was zu einem veränderten Proteinmuster führen kann. Deshalb sollten zu den Proben Proteinaseinhibitoren hinzugefügt werden.

Zusammenfassend lässt sich folgern, dass MkAk dank ihrer hohen Spezifität ein gutes Werkzeug darstellen, um kleinste antigene Unterschiede zwischen weitgehend identischen Virusstämmen aufzudecken. Darüber hinaus konnten wir einen MkAk (1238) finden, der offenbar in der Lage ist, zwischen den ähnlichen Klasse 1- und Klasse 2-Viren zu unterscheiden. Sowohl mittels MkAk als auch der 2-D PAGE war die Zuordnung eines BHV-1 Isolates in eine der 3 Virusklassen möglich.

Damit ist die auf den Protein- und Restriktionsmustern basierende Klassifizierung der bovinen Herpesviren vom Typ 1 bestätigt.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Das BHV-1 verursacht bei Rindern IBR/IPV. IBR- und IPV-Viren, wie sie früher auch genannt wurden, sind schwer zu differenzieren. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Differenzierung dieser zwei Viren mittels monoklonaler Antikörper, die mit dem Stamm LA induziert wurden, und der zweidimensionalen Polyacrylamidgelelektrophorese.
Die monoklonalen Antikörper wurden im Serumneutralisationstest auf eine biologisch wichtige Eigenschaft untersucht. Weiter wurde die Reaktivität der monoklonalen Antikörper mit zellassoziiertem und Virionantigen im Immunoblot geprüft. Schliesslich liessen sich in der indirekten Immunfluoreszenz antigene Unterschiede zwischen 17 verschiedenen BHV-1 Stämmen aufzeigen. Die Versuche ergaben, dass sich die untersuchten BHV-1 Stämme in drei Klassen einteilen lassen.
Auch mit der zweidimensionalen Polyacrylamidgelelektrophorese konnte anhand von 6 BHV-1-Stämmen eine Einteilung in 3 Klassen vorgenommen werden.
Zwischen Klasse 1- und Klasse 2-Viren bestehen nur geringgradige Unterschiede. Hingegen sind die Unterschiede zwischen Klasse 1- und Klasse 2-Viren einerseits und Klasse 3-Viren anderseits ausgeprägter.
Die meisten Isolate mit einem Klasse 1-Muster stammten aus dem Atemtrakt, diejenigen mit einem Klasse 2-Muster grösstenteils aus dem Genitaltrakt, und alle Isolate mit einem Klasse 3-Muster stammten von Rindern, die an einer nicht-eitrigen Enzephalitis litten.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Ackermann, M., Wyler, R.: The DNA of an IPV strain of bovid herpesvirus 1 in sacral ganglia during latency after intravaginal infection. Vet.Microbiol. 9, 53-63, 1984.

2. Ackermann, M., Peterhans, E., Wyler, R.: DNA of bovine herpesvirus typ 1 in the trigeminal ganglia of latently infected calves. Am.J.Vet.Res. 43, 36-40, 1982.

3. Bonin, O.: Quantitativ-virologische Methodik. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 183-186, 1973.

4. Braun, D.K., Pereira, L., Norrild, B., Roizman, B.: Application of denatured, electrophoretically separated, and immobilized lysates of herpes simplex virus-infected cells for detection of monoclonal antibodies and for studies of the properties of viral proteins. J.Virol. 46, 103-112, 1983.

5. Burnette, W.N.: "Western Blotting": Electrophoretic transfer of proteins from SDS-PAGE to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. Anal. Biochem. 112, 195-203, 1981.

6. Engels, M., Steck, F., Wyler, R.: Comparison of the genomes of infectious bovine rhinotracheitis and infectious pustular vulvovaginitis virus strains by restriction endonuclease analysis. Arch.Virol. 67, 169-174, 1981.

7. Engels, M., Gelderblom, H., Darai, G., Ludwig, H.: Goat herpesviruses: Biological and physicochemical properties. J.gen.Virol. 64, 2237-2247, 1983.

8. Engels, M.: (persönl. Mitteilung), 1984.

9. Gibbs, E.P.J., Rweyemamu, M.M: Bovine herpesviruses, Part I. Bovine Herpesvirus 1. Vet.Bull. 47, 317-343, 1977.

10. Homan, E.J., Easterday, B.C.: Isolation of bovine herpesvirus 1 from trigeminal ganglia of clinically normal cattle. Am.J.Vet.Res. 41, 1212-1213, 1980.

11. Kahrs, R.F.: Infectious bovine rhinotracheitis: A review and update. J.Am.Vet.Med.Assn. 171, 1055-1062, 1977.

12. Lämmli, U.A.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685, 1970.

13. La Thangue, N.B., Chan, W.L., Almeida, J.D.: Monoclonal antibodies to herpes simplex virus type 1 glycoproteins show that epitope location influences virus neutralisation. J. of Medical Virology 13, 227-242, 1984.

14. Ludwig, H.: Bovine herpesviruses, p. 135-214. In: B. Roizman (ed.), The herpesviruses, Vol. 2, Plenum Press, New York and London, 1983.

15. Metzler, A.E. et al.: European isolates of bovine herpesvirus 1: a comparison of restriction endonuclease sites, polypeptides and reactivity with monoclonal antibodies. Manuskript eingereicht, 1984.

16. Mohanty, S.B., Rochemann, D.D., Snyder, D.B.: Serologic cross-reaction between bovine herpesviruses 1 and 4 by the enzyme-linked immunosorbent assay. Microbiologica 7, 179-186, 1984.

17. Misra, V., Babiuk, L.A., Darcel Le Q.,C.: Analysis of bovine herpesvirus-type 1 isolates by restriction endonuclease fingerprinting. Arch. Virol. 76, 341-354, 1983.

18. O'Farrell, P.: High resolution two dimensional electrophoresis of protein. J.Biol.Chem. 10, 4007-4021, 1975.

19. Pastoret, P.P., Thiry, E., Brochier, B., Derboven, G.: Bovid herpesvirus 1 infection in cattle: Pathogenesis, latency, consequences of latency. Ann.Rech.Vet. 13, 221-235, 1982.

20. Straub, O.C.: Bovine Herpesvirusinfektionen. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1978.

21. Yewdell, J.W., Gerhard, W.: Antigenic characterization of viruses by monoclonal antibodies. Ann.Rev.Microbiol. 35, 185-206, 1981.

7. VERDANKUNGEN

Allen, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben, danke ich herzlich, besonders:

Herrn Prof. Dr. R. Wyler für die Ueberlassung des Themas und das Referat.

Herrn Prof. Dr. E. Peterhans für die Durchsicht des Manuskripts und das Korreferat.

Herrn Dr. F. Metzler für die Ueberwachung der Arbeit und die kritischen Diskussionen.

Herrn Dr. H. Matile für die Unterstützung bei den Experimenten und die wertvollen Hinweise.

Frau Ch. Gerber und Frau J. Diener für die sorgfältige Reinschrift des Manuskripts.

All jenen, die bei der Etablierung der 2-D PAGE-Methode nützliche Ratschläge erteilten.

8. LEBENSLAUF

Mirta Rüegg, am 13. März 1949 in Rüti ZH geboren.

Besuch der Primarschule in Rapperswil SG
und der Sekundarschule in Rüti ZH.

Ausübung der Berufe als Sekretärin und
später als Air Hostess.

1976 eidgen. Maturitätsprüfung, Typus D.

1976 Beginn des Veterinärstudiums an der Universität Zürich mit Staatsexamenabschluss 1981.

1982 Assistentin in einer Kleintierklinik.

Von Oktober 1982 bis April 1984 bei Prof. Dr. R. Wyler als Assistentin am Institut für Virologie an der Universität Zürich.